

**ZUM AUSSCHIEDUNGSVERHALTEN DER AMYLASE
IM SEKRET VON GESUNDEN
PAROTIS- UND SUBMANDIBULARDRÜSEN
UNTER FRAKTIONIERTER
RUHE- UND REIZABNAHME**

Evelin Hermenau

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555626_0089

Aus der Hals- Nasen- Ohrenklinik der Universität
München

Direktor Prof. Dr. H. H. Naumann

ZUM AUSSCHIEDUNGSVERHALTEN DER AMYLASE IM SEKRET
VON GESUNDEN PAROTIS- UND SUBMANDIBULARDRÜSEN
UNTER FRAKTIONIERTER RUHE- UND REIZABNAHME

Inaugural - Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von
Evelin Hermenau

aus
Miesbach

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: OA Dr. Eichner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Neumann

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 4.10.1977

Zum Ausscheidungsverhalten der Amylase im Sekret von gesunden Parotis- und Submandibulardrüsen unter fraktionierter Ruhe- und Reizabnahme.

A Einleitung

B Ermittlung des günstigsten Amylasetestverfahrens

I Definition und Umrechnung der gebräuchlichsten Einheiten

- 1) STREET-CLOSE-Einheiten
- 2) SOMOGYI-Einheiten
- 3) Internationale Einheit

II Darstellung der verschiedenen Testmethoden

- 1) Jod-Stärke-Test der Firma MERCK
- 2) DyAmyl-Test der Firma GÖDECKE
- 3) Amylopektin-Azur-Test
- 4) Amylasebestimmung durch Messung der reduzierenden Zucker
- 5) Messung der Abbauprodukte Maltose und Glucose

C Darstellung der sonstigen angewendeten Methoden

I Speichelabnahme

- 1) Technik
- 2) verwendete Reize

II Bestimmung der Flußrate

III Proteinbestimmung

IV Diskelektrophorese

V Densitometrie

D Darstellung der Ergebnisse jeweils in der Reihenfolge Ruhe, gustatorischer Reiz, Pilocarpinreiz

I Bestimmung der α -Amylase-konzentration

- 1) Parotissekret
- 2) Submandibularsekret
- II Bestimmung der Flußrate
 - 1) Parotissekret
 - 2) Submandibularsekret
- III Bestimmung der pro einer Minute ausgeschiedenen Amylaseaktivität und Summe in 50 Minuten
 - 1) Parotissekret
 - 2) Submandibularsekret
- IV Bestimmung der Gesamteiweißkonzentration
 - 1) Parotissekret
 - 2) Submandibularsekret
- V Bestimmung des Amylaseanteils am Gesamtprotein
 - 1) Parotissekret
 - 2) Submandibularsekret
- VI Aktivität der Amylase pro Milligramm Enzymprotein in Abhängigkeit von der Ausscheidungsdauer und von der ausgeschiedenen Amylasemenge.
- E Diskussion der Ergebnisse
- F Zusammenfassung



A Einleitung

Die α -Amylasen (1,4 - α -D-Glucan-4-glucanohydrolasen) sind in der Natur weit verbreitete Enzyme. Sie sind für den Abbau der Polysaccharide Stärke Amylose, Amylopektin und Glycogen von größter Bedeutung (1).

Im tierischen Bereich werden sie in den Speicheldrüsen und im Pankreas synthetisiert und finden sich mit hoher Aktivität in den Sekreten dieser Organe und im Schweiß (2). Geringe Mengen sind im Blut, Serum und Harn des Gesunden nachweisbar.

Vielfaches Vorkommen und leichte Zugänglichkeit waren gute Voraussetzungen für zahlreiche Forschungsarbeiten über Eigenschaften und Verhalten der Amylase.

So gehörte die Amylase zu den ersten bekannten Enzymen. Dokumente besitzen wir seit 1811 von G.S.C. KIRCHHOFF.

Das Enzym konnte aus Schweine- und Rattenpankreas (4), menschlichen Pankreas (5) und menschlichem Speichel (6) in Reinstform kristallisiert und charakterisiert werden.

Es hydrolysiert α -1-4 Glucanbindungen im Inneren des Polysaccharides, wodurch zunächst Dextrine und bei längerer Reaktionsdauer ein Gemisch reduzierender Zucker entsteht (7-1). Der Mechanismus ist dem der Endopeptidasen vergleichbar. β -Amylasen, die bei Pflanzen und Mikroorganismen vorkommen wirken im Prinzip wie Exopeptidasen, d.h. sie spalten randständige Maltoseeinheiten ab.

Die Hydrolyse durch α -Amylase scheint sich nach dem Prinzip der "multiple attack" abzuspielen, was bedeutet, daß in einem Enzym-Substrat-Komplex mehrere Bindungen des Polymeren hydrolysiert werden,

bevor das Enzym wieder in freier Form vorliegt (10,11).

Mehrere Isoamylasen wurden erst jüngst von MAYO und CARLSON getrennt, isoliert und analysiert (12). Einen neuen Gesichtspunkt zeigten E.J. HERE et.al. als sie fanden, daß Amylasen aus verschiedenen Quellen die Synthese von Maltose aus α -D-Glucopyranosyl-fluorid katalysieren (13).

Da die Amylase mit ca. 40% Anteil der Gesamtproteinmenge das wichtigste Eiweißprodukt der menschlichen Ohrspeicheldrüse ist und auch in der Submandibulardrüse vertreten ist, soll sie als Indikator dienen, der einfache und reproduzierbare Beobachtungen von Verlaufskontrollen bestimmter Speicheldrüsenerkrankungen ermöglicht und über Fortschreiten bzw. Besserung der jeweiligen Erkrankung Auskunft gibt. Dazu muß zunächst an Normalprobanden das Sekretionsverhalten unter Ruhe und Reiz mit verschiedenen Methoden bestimmt werden. Durch Überprüfung verschiedener Bestimmungsmethoden soll die zuverlässigste gefunden werden. Parallel dazu wurde Gesamtprotein und Flußrate bestimmt und Diskelektrophoreseläufe durchgeführt, die densitometrisch ausgewertet wurden.

B Methoden der Amylasebestimmung

- 1.) Abnahme der Viskosität einer Stärkepaste
- 2.) Photometrische Bestimmung der verbliebenen Menge Stärke durch Bildung des Jod-Stärkekomplexes (14,15)
- 3.) Messung der entstandenen reduzierenden Oligosaccharide (16-18)

4.) Freisetzung löslicher Farbstoffe aus gefärbtem Amylopektin (19,20)

Das Enzym Amylase ist durch Chlorionen aktivierbar, was bei allen nachstehenden Versuchsanordnungen berücksichtigt ist durch Zusatz dieser Ionen zum Puffersubstratgemisch. Es erwies sich aus diesem Grunde nicht als notwendig die Verdünnung der Speichelproben mit physiologischer Kochsalzlösung durchzuführen. Bei Verdünnung mit aqua bidest. war kein signifikanter Abfall der Aktivität festzustellen.

Es existieren dreierlei Definitionen für die Aktivitätsangabe der Amylase:

1 STREET-CLOSE-Einheit ist die Enzymmenge, die 20 mg Amylose bei pH 7,1 und 37 °C in 15 Minuten hydrolysiert. Die α -Amylase Aktivität wird in STREET-CLOSE-Einheiten pro 100 ml angegeben (vgl. 14).

1 SOMOGYI-Einheit ist diejenige Enzymmenge, die bei pH 7,5 und 37 °C in 30 Minuten aus Stärke 1 mg reduzierende Substanz freigibt. Das Ergebnis wird in SOMOGYI-Einheiten pro 100 ml angegeben (17).

1 Internationale Enzymeinheit (U) ist diejenige α - Amylasemenge, welche die Bindung von 1 Mikroäquivalent reduzierender Gruppen pro Minute bei 37 °C und pH 7,5 katalysiert.

Die Enzymaktivität wird in Einheiten pro Liter angegeben.

Von der relativen Abnahme der Iod-Stärke-Farbe kann man nicht direkt auf die Zahl der gebildeten Endgruppen umrechnen (22). Hier kann mit einer Methode kalibriert werden, bei der diese Gruppen

bestimmt werden (23).

Experimentell ergibt sich eine Proportionalität zwischen Messwerten der Methode nach STREET-COLSE und der Methode nach SOMOGYI modifiziert von HENRY und CHIAMORI (24), bei der die gebildeten reduzierenden Endgruppen bestimmt werden. Aufgrund des empirisch gefundenen Umrechnungsfaktors von STREET-CLOSE-Einheiten auf SOMOGYI-Einheiten (25) können folgende Beziehungen aufgestellt werden.

$$\begin{array}{lll} 1 \text{ STREET-CLOSE-Einheit} & = 3,3 \text{ SOMOGYI-Einh.} & = 0,61 \text{ U} \\ 1 \text{ SOMOGYI-Einheit} & = 0,3 \text{ STREET-CLOSE} & = 0,185 \text{ U} \\ 1 \text{ U} & = 1,64 \text{ STREET-CLOSE} & = 5,4 \text{ SOMOGYI-E.} \end{array}$$

Im folgenden werden alle Ergebnisse in U angegeben, wegen der Aktivität der Amylase im Speichel jedoch nicht auf Liter, sondern auf Milliliter bezogen $\frac{\text{U}}{\text{ml}}$.

1. Test der Firma MERCK = Stärke-Jodprobe nach STREET-CLOSE

Prinzip:

Das Substrat Amylose wird von α -Amylase zu Dextrinen und Zucker abgebaut. Auf Zusatz von Jodlösung färbt sich die noch nicht abgebaute Amylase blau. Die Abnahme der Blaufärbung ist der enthaltenen Menge Amylase direkt proportional.

Reagenzien:

- 1.) Puffer-Substrat 0,2 Amylose pro 1000 ml, 1,5 mM, Na Cl
20 mM Phosphatpuffer pH 7,1
- 2.) Farbreagenz 0,008 N Jodlösung.

Geräte:

Wasserbad 37 °C, Stoppuhr, Filter-Photometer mit

Filter der Wellenlänge 623 nm.

Durchführung:

Zur Reihenuntersuchung bietet sich der sogenannte "Mikro"-Test an.

In Reagenzgläser pipettieren:

	Analyse	Blindprobe
Puffersubstrat	1,0 ml	1,0 ml
5 Minuten im Wasserbad bei 37 °C vorwärmen		
Amylase-Lösung	0,01 ml	---
Mischen, genau 15 Minuten, bei 37 °C inkubieren		
Destilliertes Wasser	10 ml	10 ml
Farbreagenz	0,5 ml	0,5 ml

Nach 5+10 Minuten bei 623 nm Extinktion gegen Wasser messen.

Berechnung:

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{E_B - E_A}{E_B} \cdot 100 \quad \frac{\text{STREET-CLOSE-E.}}{100 \text{ ml}}$$

E_A = Extinktion Analyse

E_B = Extinktion Blindprobe

2. Dy-Amyl-Test der Firma GÖDECKE nach BABSON, TENNEY und MEGRAW (19)

Prinzip:

α - Amylase hydrolysiert das gefärbte Amylopektin zu Äthanol-löslichen Fragmenten, die kolorimetrisch gemessen werden, nachdem unhydrolysiertes Substrat und Speichelproteine mit alkoholischem Fällungsmittel ausgefällt und abzentrifugiert sind.

Reagenzien:

1.) Substrat

Zu dem Inhalt eines Fläschchens rotgefärbten Substrats 5,0 ml Aquabidest. pipettieren und

unter kräftigem Schütteln suspendieren.

2.) Fällungsmittel

Inhalt des Fläschchens Präzipitant in 50 ml kaltem 50% Methanol p.a. lösen. In gut verschlossener brauner Flasche aufbewahren.

3.) Standard

3,0 ml Aquabidest. in eine Flasche Versatol-E pipettieren, 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen lassen und zwischendurch mehrmals schwenken.

Geräte:

Wasserbad 37 °C, Stoppuhr, Laborzentrifuge, Filterphotometer mit Filter der Wellenlänge 540 nm.

Durchführung:

In Zentrifugengläser pipettieren:

	Analyse	Blindprobe
Substrat:	0,5 ml	0,5 ml
5 Minuten bei 37 °C im Wasserbad vorwärmen		
Amylaselösung	0,1 ml	-----
Standard Versatol-E.	-----	0,1 ml
Gut mischen bei 37 °C genau 10 Minuten inkubieren		
Fällungslösung	2,5 ml	2,5 ml

Bei 3000-5000 Umdrehungen/Minute ca. 10 Minuten zentrifugieren.

Überstand abpipettieren oder vorsichtig abgießen und bei 540 nm die Extinktion gegen die Fällungslösung ablesen.

Berechnung: $\frac{\text{Extinktion Probe}}{\text{Extinktion-Versatol-E}}$

= Aktivität
Versatol-E =
= Amylase Akt.
der Probe

Die Aktivität des Versatol-E muß dem Packzettel der Firma entnommen werden.

3.) Bestimmung der Amylase mit Amylopektin Azur (20)

Prinzip:

Amylase setzt aus dem Substrat lösliche Oligosaccharide frei, die mit dem Farbstoff Remazolbrillant Blau markiert sind. Die photometrische Messung des gelösten Farbanteiles ermöglicht eine Bestimmung der Amylaseaktivität.

Reagenzien:

1.) Amylopektin Azur der Firma CALBIOCHEM.

2.) Trispuffer.

6,06 g Trishydroxymethylaminomethan werden mit 5,60 g NaCl in 200 ml destilliertem Wasser gelöst.

Der pH-Wert wird mit 1 N HCl auf 7,5 eingestellt, die Lösung mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

3.) Azeton-Essigsäure 1:1

Geräte:

Wasserbad bei 37 °C, Stoppuhr, Filterphotometer mit Filter der Wellenlänge 595 nm, Laborzentrifuge.

Durchführung:

	Analyse	Blindprobe
Puffersubstrat	40 mg Amylopektin in 2ml Trispuffer suspendiert	wie bei Analyse
5 Minuten im Wasserbad bei 37 °C vorwärmen.		
Amylase-Lösung	0,1 ml	----
Mischen genau 10 Minuten inkubieren bei 37 °C.		
Azeton-Essigsäure	1 ml	1 ml

Bei 600 - 2000 U/Min. zentrifugieren, Extinktion des Überstandes bei 595 nm innerhalb von 4 Stunden messen.

Berechnung:

$$(\text{Extinktion Probe} - \text{Extinktion Leerwert}) \cdot F = \text{Amylaseaktivität in U/l}$$

Der Faktor F ergibt sich durch die Standardisierung jeder Charge Amylopektin Azur, welche von WEIS und Mitarbeitern durch Vergleich der mit STREET-CLOSE (14)- und FRIED-HOEFELMAYR (2)- Methoden erhaltenen Extinktionen erreicht wurde. Der Faktor beträgt etwa 470 und kann Schwankungen von $\pm 5\%$ aufweisen, da bei Herstellung des Substrates das Verhältnis von Remazolbrillant-Blau-Molekülen nicht exakt konstant gehalten werden kann.

4.) Amylasebestimmung durch Messung der reduzierenden Zucker (26)

Prinzip:

Stärke wird durch α -Amylase zu Bruchstücken hydrolysiert, deren reduzierende Hemiacetalgruppen mit 3,5-Dinitrosalicylsäure bestimmt werden.

Die Konzentration der entstandenen Nitroaminosalicylsäure wird photometrisch gemessen; sie entspricht der Konzentration der neugebildeten Endgruppen und damit direkt der Enzymaktivität.

Reagenzien:

- 1.) Dinatriumhydrogenphosphat, $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, p.a.
- 2.) Kaliumdihydrogenphosphat $\text{KH}_2 \text{PO}_4$, p.a.
- 3.) Kochsalzlösung 0,9 %
- 4.) Natronlauge, 0,1 N; 1,0 N

5.) Stärke löslich nach Zulkovsky, p.s.

6.) 3,5-Dinitrosalicylsäure

7.) Kalium-Natrium-Tartrat, p.a.

8.) D (+) - Maltose

Herstellung der Lösungen

a) Phosphatpuffer (20 mM, pH=6,9, 10 mM NaCl)

1,97 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 1,23 g KH_2PO_4 in ca.
800 ml Aquabidest. lösen 65 ml 0,9 % NaCl-Lösung
zugeben, mit 0,1 N NaOH auf pH 6,9 einstellen,
mit Aquabidest. auf 1000 ml auffüllen.

b) Stärkelösung (1%) : (Stärke nach Zulkovsky)

1,0g Stärke in Phosphatpuffer (Lösung a) ad
100 ml lösen.

c) Dinitrosalicylsäurereagens (1% 3,5-Dinitrosalicyl-
säure, 30% Kalium-Natrium-Tartrat) : 10g 3,5-Dini-
trosalicylsäure in ca. 300 ml bidest. Wasser und
400 ml 1 N NaOH lösen, 300 g Kalium-Natrium-Tartrat
zugeben, unter Erwärmen lösen, mit bidest. Wasser
ad 1000 ml auffüllen.

d) Maltose Standardlösung:

Wassergehalt der D (+) - Maltose bestimmen, 100,0
mg Maltose in bidest. Wasser ad 100 ml lösen.
Konzentration (ca. 2,5 mM) unter Berücksichtigung
des Wassergehaltes berechnen.

Geräte:

Filterphotometer zur Messung bei 546-550 nm; Wasser-
bäder 25 °C und 100 °C, Stoppuhr.

Durchführung:

Meßstrahlung: Hg 546 nm; Schichtdicke 1 cm; Volumen
des Inkubationsansatzes 2,05 ml; Inkubationstemperatur

25 °C; Volumen der Meßlösung: 4,5 ml, Messung gegen Wasser; Substratlösung vor Versuchsbeginn auf 25 °C bringen.

In 12 ml Zentrifugengläser im 25 °C Wasserbad pipettieren	Analyse	Leerwert
Puffer a	1,0 ml	1,0 ml
Amylase-Lösung verdünnt	0,05 ml	---
Substratlösung b	1,0 ml	1,0 ml
Mischen, gleichzeitig Stoppuhr drücken und genau 10 Minuten inkubieren		
Dinitrosalicylsäurereagens c	2,0 ml	2,0 ml
Enzym-Lösung	---	0,05 ml
Mischen, Gläser mit Glaskugel verschließen und 5 Minuten im 100 °C Wasserbad erhitzen. In kaltem Wasser abkühlen und nach 20-60 Minuten Extinktion messen.		

Berechnung:

Herstellung einer Eichkurve mit Maltose.

In 12-ml-Zentrifugenröhrchen 0,2 - 1,0 ml Maltose-Standard-Lösung (d) mit bidest. Wasser ad 1,05 ml auffüllen, Leerwert mit 1,05 ml bidest. Wasser ansetzen.

Zu allen Röhrchen 1,0 ml Substratlösung (b) und 2,0 ml Dinitrosalicylsäurereagens (c) zugeben, gut mischen. Weiterbehandeln wie die Amylasebestimmungen, Extinktionen gegen μ Mol Maltose pro Ansatz auftragen.

Extinktionen der Leerwerte von denjenigen der Hauptwerte abziehen, man erhält ΔE .

Für die hier angegebenen Bedingungen (Meßstrahlung 546 nm) gilt für die Probe:

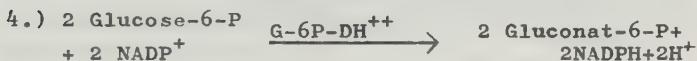
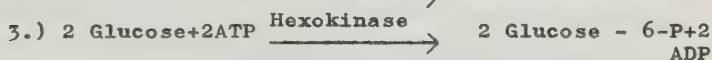
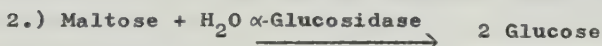
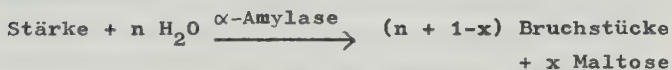
Amylaseaktivität = 4950 . ΔE (U/l)

5.) Messung der Abbauprodukte Maltose und Glucose. (27)

Beim Abbau von Stärke durch α -Amylase bildet sich neben höher- und niedermolekularen Bruchstücken auch Maltose. Diese kann in einem UV-Test bestimmt werden.

Eine fortlaufende Messung gelang bisher nicht. Das hier beschriebene Verfahren wurde für Serum und Harn ausgearbeitet.

Prinzip:



Schon das Prinzip zeigt die Kompliziertheit dieser Methode auf. Es sind mehrere Arbeitsgänge mit dazwischenliegenden Inkubationszeiten und einer Zentrifugation notwendig.

Für die Anwendung bei Best. von etwa 20-30 Proben pro Patient erscheint der Aufwand zu groß.

C Darstellung sonstiger Arbeitsmethoden

Entnahme der Speichelproben:

Mit einem Polyäthylenschlauch mit Innendurchmesser 0,5 mm und Außendurchmesser 1,0 mm wird die Mündungsstelle des Drüsenausführungsganges bukkal an der Papilla parotidea zur Entnahme des Parotissekretes und an der Caruncula sublingualis zur Entnahme des Submandibulärsekretes punktiert und dann der Schlauch etwa 20 mm in den Ausführungsgang hineingeschoben. An Kinn oder Wange wird der Schlauch mit einem Leukoplaststreifen fixiert. Der Schlauch ist so lange zu wählen, daß das Sekret über einen Fraktionsteiler in Reagenzgläser geleitet werden kann. Dabei ist zu beachten, daß das Sekret nicht unter Druck ausgeschieden wird, weshalb der Verlauf des ableitenden Schlauches und die Sammelgläser nicht über dem Niveau der Drüse liegen dürfen.

Die Stimulation mit Ascorbinsäure:

Als gustatorisch wirksamer Reiz wurde Ascorbinsäure in Form von Cebionlutschtabletten über 30 Minuten verabreicht.

Die Stimulation mit Pilocarpin:

Pilocarpin wurde subcutan injiziert in einer Menge von 0,075 mg/kg Körpergewicht.

Bestimmung der Flußrate:

Mit einer Pipettierhilfe wird das Sekret in die jeweils kleinste brauchbare Messpipette (2 ml, 5 ml, 10 ml) aufgezogen und die Menge abgelesen. Da die Zeit, in welcher die bestimmte Menge ausgeschieden wurde, bekannt ist, läßt sich daraus die Flußrate berechnen.

Bestimmung des Eiweißgehaltes mit der Biuretmethode

Prinzip:

Substanzen, die zwei oder mehr Peptidbindungen enthalten, bilden einen violetten Komplex mit Kupfersalzen in alkalischer Lösung (28).

Herstellung des bei uns üblichen Biuretreagenzes:

0,3 g Kupfersulfat ($\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$) werden in 50 ml Aqua bidest. gelöst und mit 60 Teilen 2 N Natronlauge und 40 Teilen Äthylenglykol auf 150 ml aufgefüllt.

Durchführung:

0,25 ml der Probe und 0,75 ml Biuretreagenz mischen und bei Raumtemperatur 20 Minuten stehen lassen.

Mit dem Photometer bei der Wellenlänge 546 nm, in der 1 ml Küvette, Schichtdicke 1 cm, Extinktion gegen den Leerwert = 0,25 ml H_2O und 0,75 ml Biuretreagenz messen.

Der Proteingehalt wird über eine Eichkurve ermittelt, die durch Einwägung dialysierter Amylase aufgestellt wurde.

Wie PÅL ARNEBERG (32) berichtet, ergibt die Biuretmethode von den colorimetrischen Proteinbestimmungsverfahren die konstantesten Ergebnisse für die verschiedenen Proteine. Da Amylase zumindest für den Parotisspeichel das mengenmäßig bedeutendste Protein ist, wurde sie auch zur Aufstellung der Eichkurve verwendet. Im biologischen Material sind praktisch keine Substanzen, außer den Proteinen, die die Biuret-Reaktion in einem Maße eingehen, daß signifikante Beeinflussung stattfindet.

Diskelektrophorese (30)

Elektrophoretische Wanderung hängt von einer Reihe von Parametern ab:

- 1.) Größe, Gestalt, Konzentration, elektrische Ladung, Hydratation und Dissoziation des Teilchens.
- 2.) Viskosität, pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke des Mediums.
- 3.) elektrische Feldstärke, Elektrophorese-Zeit und Länge des Trennweges.

Die Beziehung zwischen elektrophoretischer Beweglichkeit, Wanderungsgeschwindigkeit, Feldstärke, pH-Wert und Ionenstärke gelten gleichermaßen für freie und Träger-Elektrophorese. Bei Träger-Elektrophorese machen sich zusätzliche Faktoren bemerkbar, die auf Beweglichkeit und Trennschärfe einwirken: Adsorption, Inhomogenität und Austauschkapazität des Trägermaterials, Elektroosmose, Sogeffekte, Einflüsse durch Erwärmung und Verdunstung. Das Polyacrylamid-Gel besitzt den Vorteil, daß Adsorption und Elektroosmose keine Rolle spielen.

"In der Disk-Elektrophorese liegt ein hinsichtlich pH-Wert, Pufferzusammensetzung und Gelporengröße diskontinuierliches Trennsystem vor, das Polyacrylamid Gel als Träger verwendet. Während die kontinuierliche Polyacrylamidgel-Elektrophorese homogene Puffersysteme einheitlicher pH-Werte verwendet, führt die diskontinuierliche Polyacrylamid-Elektrophorese Pufferpaare unterschiedlicher pH-Werte und Zusammensetzungen, sowie Gelteile unterschiedlicher Porengröße ein. Diese Diskontinuitäten erzeugen vor Trennbeginn sehr schmale, das heißt hochkonzentrierte Startzonen, die für die Schärfe der Trennungen entscheidend sind." (nach MAURER, 30)

Die Polyacrylamidgele sind Polymerisations- und Vernetzungsprodukte von Acrylsäureamid und einem Vernetzer, meist N-N' - Methylenebisacrylsäureamid. Es entsteht ein dreidimensionales Maschenwerk, dessen Viskosität, Elastizität und Festigkeit vom Polymerisationsgrad (Kettenlänge) des Polyacrylamids und vom Vernetzungsgrad (Menge des eingebauten Vernetzers) abhängen. Die Dichte dieses Gitterwerkes läßt sich als durchschnittliche Porengröße ausdrücken und spielt für die Trennung von Molekülen verschiedener Größe und Gestalt nach dem Molekularsieb-Effekt eine wichtige Rolle. Die Porengröße kann man durch die Wahl einer geeigneten Acrylamid-Konzentration steuern, vorausgesetzt vollständige Umwandlung von Monomer zu Polymer findet statt. Zur Kopolymerisation von Polyacrylamidgelen werden gewöhnlich Katalysator-Redoxsysteme verwendet, die freie Radikale liefern. Für unsere Bestimmung verwenden wir Gel-System 1, nach MAURER, ein 75%iges mittelporiges Gel bei pH 8,9.

Proteine vom Molekulargewicht 10^4 - 10^6 können getrennt werden, der optimale Auflösungsbereich liegt zwischen 3×10^4 bis 3×10^5 . Die Trennung findet bei pH 9,5 statt. Es wurde nur ein einteiliges Gel hergestellt, das großporige Sammelgel fällt weg. Unterschichten des Elektrolytpuffers mit der Speichelprobe und die geringe Feldstärke mit der zu Beginn gefahren wird, begünstigt auch ohne großporiges Gel die Konzentration der Proteine auf der Oberfläche des Trenngels. Die Ionen des überstehenden Puffers wirken, auch ohne Gel als sogenannte

Folge-Ionen in der Konzentrationsphase und überholen die Proteine in der Trennphase.

"Der Wirkungsgrad des Fixierens und Färbens der getrennten Substanzen sowie des Entfärbens ist ausschlaggebend für die Qualität der Auswertung." Von den zur Verfügung stehenden Farbstoffen haben wir Coomassie Brillant Blau R 250 ausgewählt, da er sich durch hohe Empfindlichkeit und bemerkenswerte Gleichmäßigkeit der Bindung mit verschiedenen Proteinen auszeichnet, und dies für die quantitative Proteinbestimmung durch Densitometrie vorteilhaft ist.

Ein Nachteil der Coomassiefärbung ist, daß zwischen eng beieinander liegenden Banden ein erhöhter Farbstoff-Untergrund auftreten kann, der die quantitative Densitometrie leicht verfälschen kann. Weitere Einflüsse, die das Verhältnis zwischen der Lichtabsorption des Substanz-Farbstoffkomplexes und der Substanzmenge nichtliniar gestalten: Polychromie des Farbstoffes, Interferenz und Reflexion sowie unterschiedliche Bandenkrümmungen. Die bei quantitativer Auswertung entstehenden Fehler dürften immer wieder gleich gross sein, sodaß ein Vergleich der Gele untereinander vorgenommen werden kann, auch wenn die absoluten Werte nicht genau der Wirklichkeit entsprechen. Zur densitometrischen Auswertung wurde das Gerät "Vernon, Photometre, integrateur, enregistreur Typ TRD" verwendet, das in einem Arbeitsgang die Gele photometrisch auswertet, das Integral der Fläche unter der ermittelten Kurve bildet und mit einem Impulsschreiber die Größe der bestimmten Fläche sichtbar macht.

Nach Abzählen der Impulse einer Bande und der Gesamtimpulse des Gels ist es möglich den Proteinanteil dieser Bande am Gesamtprotein zu errechnen

Von 43 speicheldrüisengesunden Probanden wurde aus Parotis und Submandibulardrüse jeweils drei Fraktionen Ruhesekret und 8 Fraktionen Reizsekret, Ascorbinsäure- oder Pilocarpinreiz, pro Drüse gewonnen.

D Ergebnisse:

1.) Bestimmung der α -Amylasekonzentration Ruhesekretion.

Die Ruheaktivität der Amylase liegt durchschnittlich zwischen 100 und 400 U/ml bei einigen Probanden auch darüber bis 600 U/ml.

Gustatorische Stimulation.

Nach Einsetzen des gustatorischen Reizes haben wir keine einheitliche Verlaufstendenz, jedoch fallen die sehr hohen Ruhewerte bis in den durchschnittlichen Ruhebereich ab, sodaß eine Annäherung aller Proben zwischen 150 und 450 U/ml stattfindet. Danach ergibt sich wieder eine stärkere Fächerung der Werte durch leichten, kontinuierlichen Anstieg mehrerer Kurven über 20 bis 30 Minuten. Insgesamt werden die von den Ruhewerten vorgezeichneten Grenzen kaum überschritten (Abb 1).

Der Vergleich der Sekretion beider Drüsen eines Individuums zeigt, daß der ausgeschiedene Speichel nicht genau gleich große Aktivität hat, aber daß sie im gleichen Bereich liegt. Die Verlaufstendenzen beider Seiten ist ähnlich, sodaß die intraindividuellen Unterschiede geringer sind, als die interindividuellen

Pilocarpin-Stimulation.

Wie durch Vorversuche schon ermittelt, zeigt sich während der ersten 10 Minuten meist nur geringe

AMYLASEKONZENTRATION IM PAROTISSEKRET

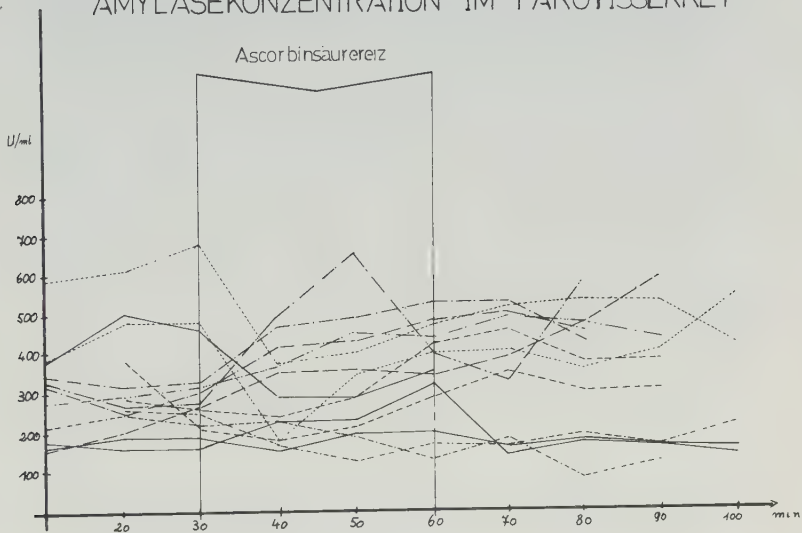


Abb. 1 Amylasekonzentration im Parotissekret
bei Ascorbinsäurereiz: keine eindeutigen
Konzentrationsänderungen

Reaktion, da das Pharmakon erst nach systemischer Verteilung auch auf die Speicheldrüsen wirken kann. Im Gegensatz zum gustatorischen Reiz haben wir eine ganz eindeutige Reaktion, nämlich starken Anstieg der Konzentration. Die Werte können das Drei- bis Vierfache ihres Ruhewertes erreichen, sodaß die höchsten Konzentrationen etwa bei 1200 u/ml liegen, und auch die niedrigsten über 600 U/ml ansteigen. Die höchsten Werte werden nach 20 - 40 Minuten erreicht. Der Anstieg erfolgt oft sehr schnell, der Rückgang der Aktivität verläuft meist nicht geradlinig, sondern unter erheblichen Schwankungen (Abb2). Die Sekretabnahme wurde meist 60 Minuten nach der Stimulation beendet. In keinem Fall wurde in dieser Zeit eine Rückkehr zu den Ausgangswerten beobachtet.

Die intraindividuellen Unterschiede, scheinen sich auch hier auf einen engeren Bereich zu beschränken als die interindividuellen doch ist der Verlauf keineswegs simultan.

Bei allen Probanden, für welche die Serumamylaseaktivität nach Ende der Speichelabnahme mitbestimmt wurde, fand ich Werte zwischen 80 und 370 mU/ml, was für die Messmethode nach Angabe der Firma MERCK dem Normalbereich entspricht. Eine Korrelation zwischen hohen Amylasewerten im Serum einerseits und Speichel andererseits konnte nicht festgestellt werden.

2.) Submandibulardrüse

Ruhesekretion.

Die Ruhekonzentration liegt zwischen 10 und 55 U/ml

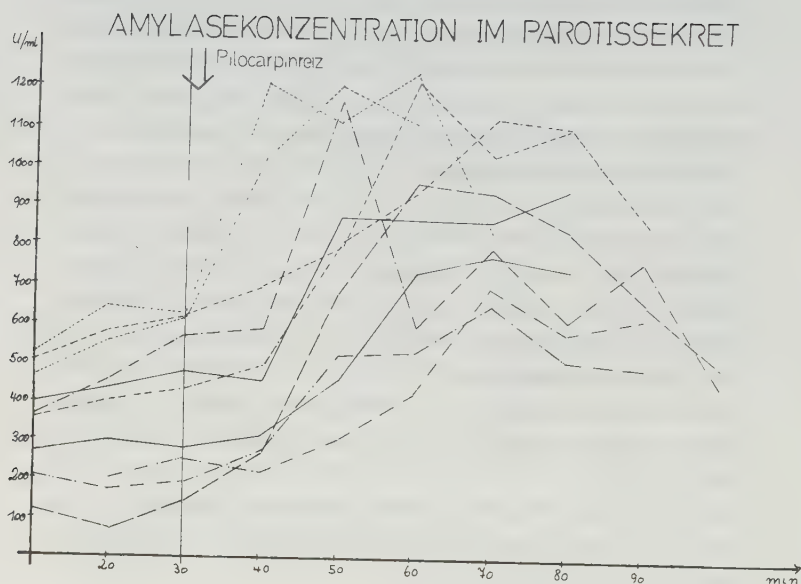


Abb. 2 Amylasekonzentration im Parotissekret
bei Pilocarpinreiz: eindeutiger Anstieg
bei allen Probanden

mit recht gleichmäßiger Verteilung der Werte im ganzen Bereich.

Gustatorische Stimulation

bei gustatorischem Reiz zeigt sich, nach anfänglich uneinheitlichem Verlauf, ein allgemeiner Anstieg der Konzentration, der im Gegensatz zu der Ohrspeicheldrüse verhältnismäßig weit über die Ruhewerte hinaus reichen kann. Jede Kurve zeigt mindestens einen Punkt, der deutlich höher liegt als der Ruhewert direkt vor Beginn des Reizes. Die Höchstwerte liegen zwischen 60 und 100 U/ml. Nach Abbruch der Cebion-Dauerstimulation findet man rasche Rückkehr in die Nähe der Ruhewerte, manchmal auch etwas darunter (Abb. 3).

Pilocarpin-Stimulation.

Bei Pilocarpinreiz zeigt sich wie bei der Parotis die Verzögerung der Reaktion. Nach 20 Minuten wird, im Gegensatz zu den Ergebnissen bei der Parotis, von allen Kurven ein recht eindeutiger Höchstwert erreicht, der 20 - 70 U/ml über den Ruhewerten liegt. Im Gegensatz zur Parotis steht auch das Ergebnis, daß die Ruhewerte, nach gleichmäßigem Abfall innerhalb des Beobachtungszeitraumes wieder erreicht werden (Abb 4).

Wie bei der Parotis, deutet sich auch für die Submandibulardrüse die Tatsache an, daß gleichzeitig abgenommener Speichel der rechten und linken Seite geringere Unterschiede aufweist, als der Submandibularspeichel verschiedener Personen.

Da die Amylasekonzentration stark von der Flußrate abhängig ist, ist sie alleine als Indikator für

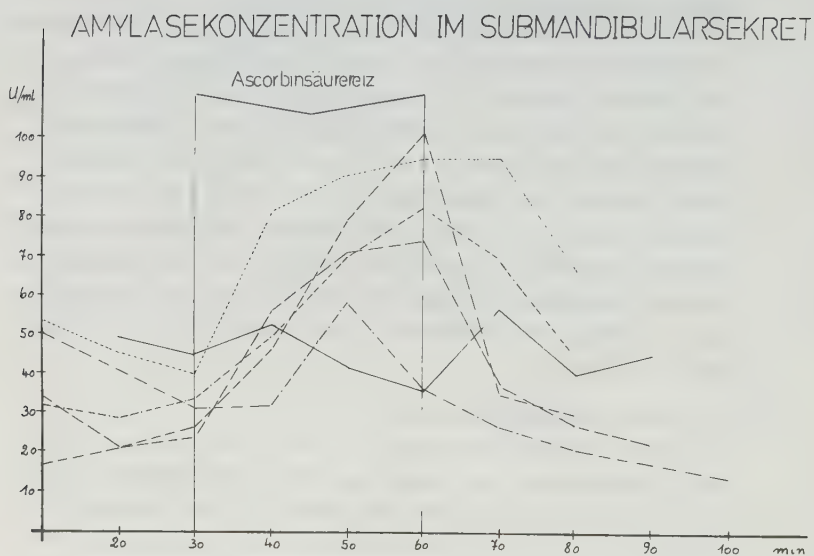


Abb. 3 Amylasekonzentration im Submandibularsekret bei Ascorbinsäurereiz: erkennbarer Anstieg

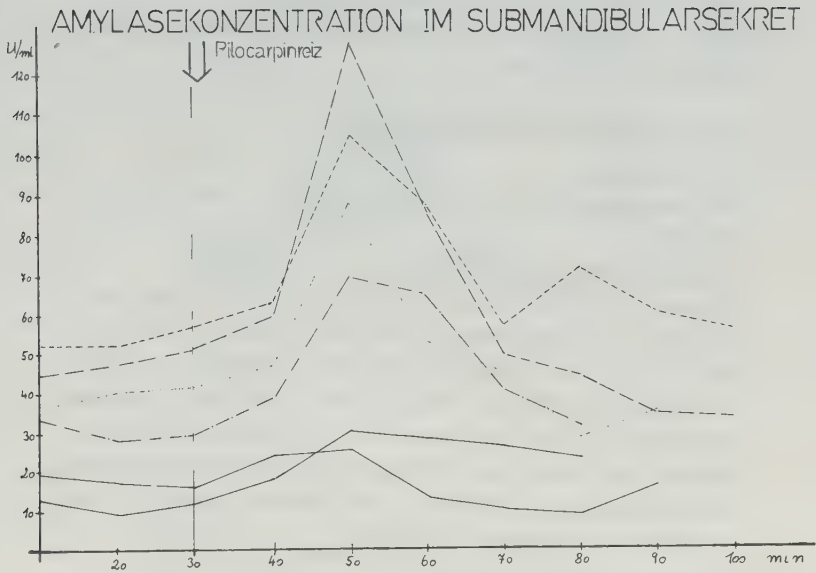


Abb. 4 Amylasekonzentration im Submandibularsekret bei Pilocarpinreiz: mit Ausnahme eines Probanden sehr deutlicher Anstieg

den Zustand einer Drüse nicht gut geeignet. Zunächst wurden die Flußraten bestimmt, mit deren Hilfe dann die Amylasesekretionsrate (U/min.) errechnet werden soll.

II. Bestimmung der Flußrate.

1.) Parotis

Die Ruheausscheidung liegt zwischen 0,02 und 0,13 ml/min.

Gustatorische Stimulation.

Sofort nach Einsetzen der Stimulation findet ein rascher Anstieg auf die zwei- bis vierfache Flußrate statt, der sich noch 10 Minuten nach Reizen weiter fortsetzt, danach Konstanz oder leichtes Absinken der Speichelsekretion. Rückkehr zu den Ruhewerten innerhalb von 20 Minuten nach Reizende. Die Höchstwerte der Flußraten liegen vermehrt bei 0,4 bis 0,55 ml/min. (Abb 5).

Pilocarpin-Stimulation

Die um 10 Minuten verzögerte Reaktion findet man auch bei Bestimmung der Flußrate wieder. 20 - 30 Minuten nach Pilocarpinapplikation werden die höchsten Flußraten zwischen 0,4 und 0,65 ml/min. gefunden. Danach allmähliche Rückkehr zu den Ruhewerten, die innerhalb des beobachteten Zeitraumes im allgemeinen nicht erreicht werden, wie dies auch schon für die Amylaseaktivität festgestellt werden konnte (Abb 6).

2.) Submandibulardrüse.

Ruheseekretion

Die Ruheausscheidung liegt hier höher als bei der

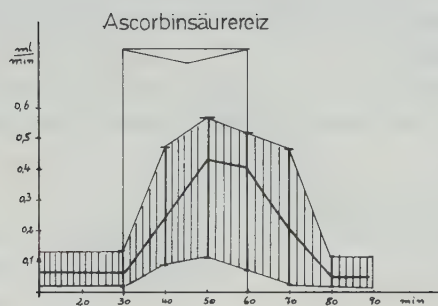


Abb. 5 Flußrate der Parotis bei gustatorischem Reiz

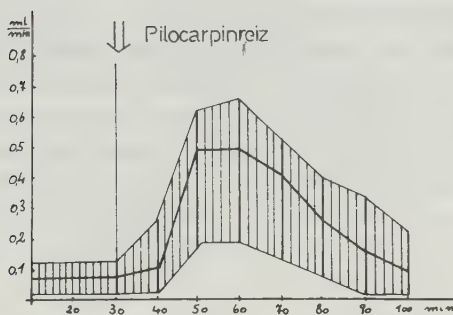


Abb. 6 Flußrate der Parotis bei Pilocarpinreiz

Parotis, bei den untersuchten Proben zwischen 0,02 und 0,4 ml/min. mit einer Anhäufung im Bereich von 0,1 - 0,3 ml/min.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die Submandibulardrüse an der Gesamtruheseekretion einen Anteil von durchschnittlichen 60 - 70 % hat.

Gustatorische Stimulation.

Mit Ascorbinsäurereiz wird sehr ähnliches Verhalten der Flußraten wie bei der Parotis gefunden, wobei ebenfalls Mengen von 0,3 - 0,55 ml Speichel pro Minute ausgeschieden werden. Das bedeutet, daß bei gustatorischem Reiz der Gesamt-Speichel je zur Hälfte von Parotis und Submandibularis gebildet wird. Die Rückkehr zu den Ruhewerten erfolgt bei der Submandibulardrüse ohne Verzögerung (Abb 7).

Pilocarpin-Stimulation.

Die Submandibulardrüse scheint etwas schneller auf Pilocarpinreiz zu reagieren als die Parotis, da in beinahe allen Fällen schon in den ersten 10 Minuten ein eindeutiger Anstieg der Flußrate festzustellen ist. In den meisten Fällen wird schon nach weiteren 10 Minuten der Höchstwert beobachtet, der beträchtlich über den Parotiswerten liegt, bei 0,45 - 9 ml/min. Innerhalb 40 Minuten Rückkehr in den Bereich der Ruhewerte, im Gegensatz zur Parotis (Abb 8).

	<u>Ruhe</u>	<u>Cebion</u>	<u>Pilocarpin</u>
<u>Parotis</u>	0,02-0,1	0,4-0,55	0,4-0,65
<u>Submandibularis</u>	0,02-0,4	0,3-0,55	0,45-0,9

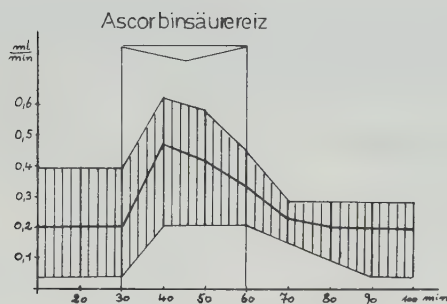


Abb. 7 Flußrate der Submandibulardrüse bei gustatorischem Reiz

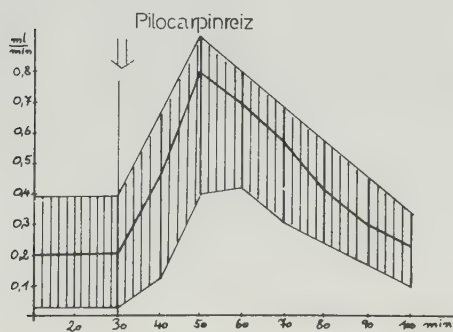


Abb. 8 Flußrate der Submandibulardrüse bei Pilocarpinreiz

Aus den bis jetzt vorliegenden Ergebnissen wird die pro Minute ausgeschiedene Amylaseaktivität errechnet und dargestellt.

III Pro Minute ausgeschiedene Amylaseaktivität

1.) Parotis

Ruhewerte.

Die Ruhewerte liegen zwischen 4 bis 40 U/Min. wobei keine Abhängigkeit zwischen hohen Flußraten und hohen Enzymkonzentrationen festzustellen ist.

Gustatorische Stimulation.

Die Amylaseausscheidung steigt sofort nach Einsetzen des Reizes steil an und erreicht Werte, die das 5 - 12 fache der Ruheausscheidung betragen. Da die Enzymaktivität pro ml Speichel, wie oben gezeigt, annähernd konstant ist, kann erst durch Einbeziehung der Flußrate die stark gesteigerte Enzymausschüttung von 60 - 280 U/ml erkannt werden. Die Abbildung zeigt, daß der zeitliche Verlauf der Enzymfreisetzung sehr unterschiedlich sein kann. In den Fällen, in denen sehr hohe Spitzenwerte von 260-280 U/min. auftreten, fällt trotz andauernder Stimulation die ausgeschiedene Amylasemenge schnell auf wesentlich geringere Werte zurück (Abb 9). Die Ruhewerte werden etwa 20 Minuten nach Reizende wieder erreicht.

Addiert man die Enzymmengen, die von Reizbeginn bis 20 Minuten nach Reizende ausgeschieden werden, so erhält man Werte, die hauptsächlich im Bereich zwischen 3000 - 5000 U/50 Min. liegen, aber auch bis 7000 U/50 Min. ansteigen können.

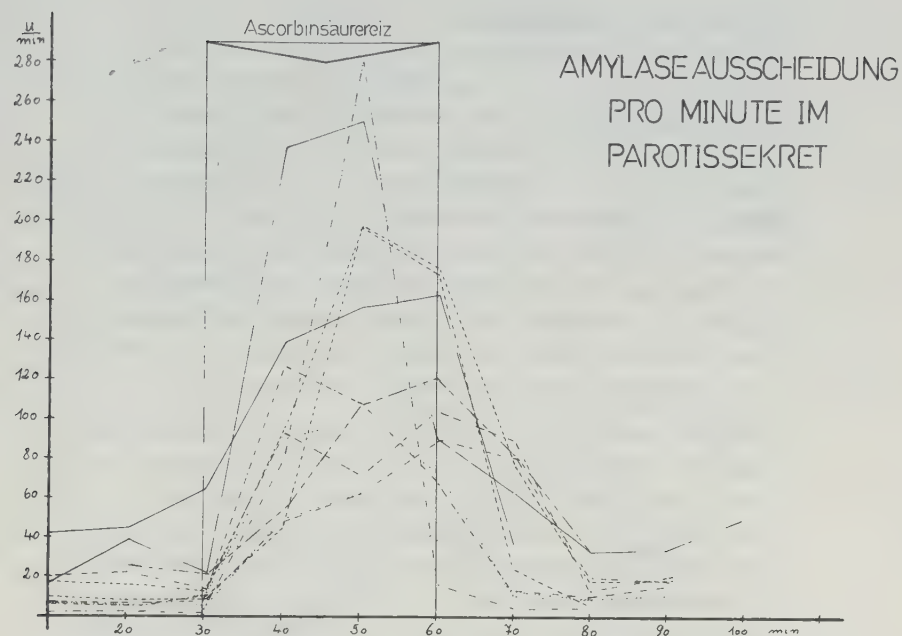


Abb. 9 Amylaseausscheidung pro Minute im Parotissekret bei Ascorbinsäurereiz:
hoher Anstieg bei allen untersuchten Probanden auf Grund der gestiegenen Flußrate

Pilocarpin-Stimulation.

Durch Aufeinandertreffen von erhöhter Amylaseaktivität pro ml und gesteigerter Flußrate zeigt die Parotis sehr hohen Anstieg der Amylaseausscheidung, die eindeutig über der durch Cebionreiz bewirkbaren Ausscheidung liegt. Die Werte liegen durchschnittlich zwischen 250 und 400 U/Min. Manche steigen bis nahe 500 U/min. an. Spätestens 40 Minuten nach Stimulation ist der Höhepunkt erreicht. Da Flußrate und Konzentration im Beobachtungszeitraum die Ruhewerte nicht wieder erreichten, war dies auch hier nicht zu erwarten (Abb 10).

Addiert man die in 50 Minuten nach Reiz ausgeschiedene Enzymmenge, so ist sie beträchtlich höher als bei Cebionreiz. Die Untergrenze liegt etwa bei 6000 U/50 min., die Obergrenze bei 15000 U/50 min., mit Durchschnittswerten bei 7000 - 9000 U/50 min. Ob diese hohe Ausscheidungsrate am Enzymeinheiten eine Erschöpfung der Drüse bewirken kann, oder ob die Eiweißsynthese eine so große Steigerung erfahren kann, wie die Enzymausschüttung, ist nicht geklärt. In jedem Fall scheint es wahrscheinlich, daß ein so starker Reiz eine "Produktionsschwäche" einer erkrankten Drüse aufdecken kann.

2.) Submandibulardrüse

Ruhewerte.

Obwohl die Submandibulardrüse, wie oben gezeigt, 60 - 70 % des Ruhespeichels liefert, ist die Amylaseausscheidung in der Zeiteinheit viel geringer als bei der Parotis.

Sie beträgt nur etwa 1 - 10 U/min., d.h. etwa 1/5

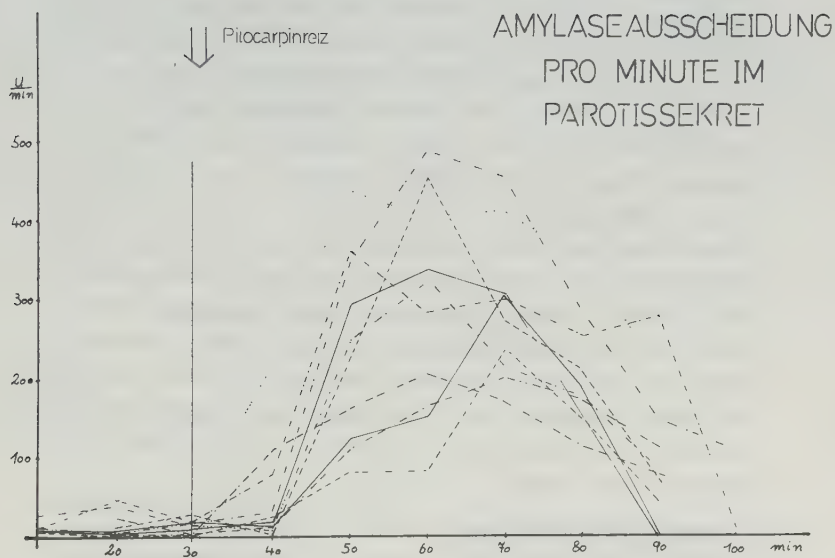


Abb. 10 Amylaseausscheidung pro Minute im Parotissekret bei Pilocarpinreiz: extrem hohe Werte werden erreicht (Beachten Sie den unterschiedlichen Maßstab an der Ordinate)

der im Ruhespeichel enthaltenen Amylase stammt aus dieser Quelle.

Gustatorischer Reiz.

Gesteigerte Amylaseaktivität pro ml und deutlich gestiegene Flußrate bewirken natürlich gesteigerte Amylaseausschüttung in der Zeiteinheit. Nach 10 - 30 Minuten ist ein Höchstwert erreicht, der etwa beim 2,5 - 3,5 fachen der Ruhewerte liegt. Nach Reizende findet man schnelle Rückkehr zu den Ruhewerten (Abb 11).

Bildet man auch hier die Summe der in den drei Reizfraktionen und den beiden folgenden sezernierten Amylase, so ergeben sich Werte etwa zwischen 650 - 1200 U/50 min. Das bedeutet, daß die Submandibular-drüse bei Ascorbinsäurestimulation nur etwa 10 - 15 % des Amylasegehaltes des Reizsekretes bildet. Ihr Beitrag zur Stärkeverdauung bei Reiz ist also noch geringer als in Ruhe.

Pilocarpinstimulation.

Bemerkenswert ist bei diesem Reiz der einheitliche Höchstwert aller untersuchten Speichelproben 20 Minuten nach der Stimulation. Während die Parotis über lange Zeit mit einer stark erhöhten Amylaseausschüttung reagiert, folgt hier zunächst rasche, dann langsamere Rückkehr zu den Ruhewerten (Abb 12).

Ebenso wie bei der Parotis bewirkt Pilocarpin hier einen wesentlich höheren Reiz als Ascorbinsäure. Die Höhepunkte liegen zwischen 30 und 110 U/min. Errechnet man die gesamte in 50 Minuten ausgeschiedene Amylasemenge, so liegt die Untergrenze bei 700 U, die durchschnittlichen Werte bei 1200 - 1600 U,

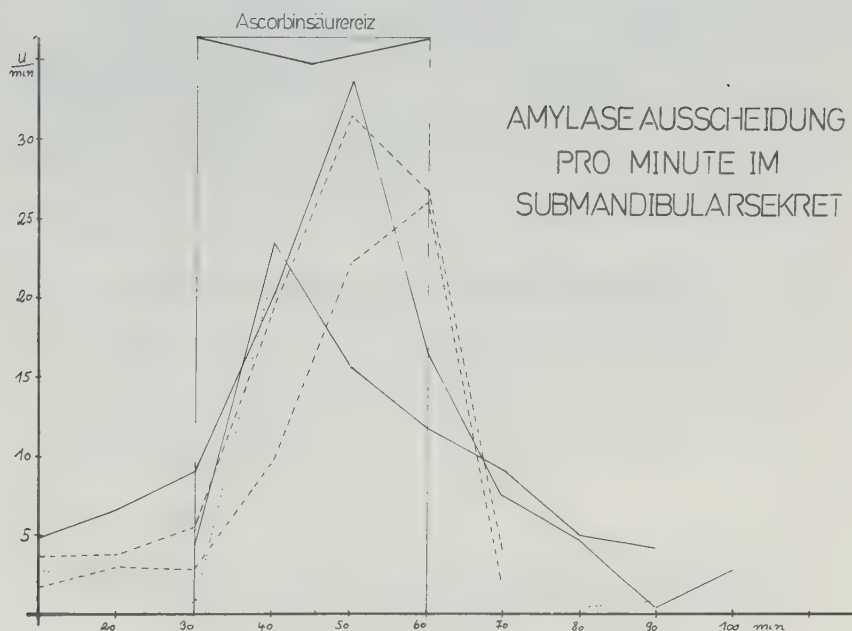


Abb. 11 Amylaseausscheidung pro Minute im Submandibularsekret bei Ascorbinsäurereiz: hoher Anstieg gegenüber den Ruhewerten Unterschied zur Parotis etwa von der Größe des Faktors 10

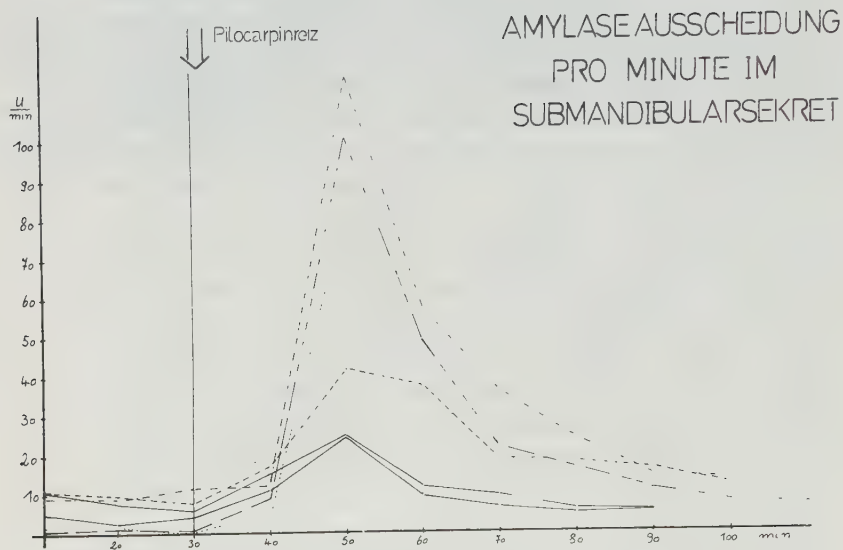


Abb. 12 Amylaseausscheidung pro Minute im Submandibularsekret bei Pilocarpinreiz:
Anstieg durchschnittlich 3mal so hoch
wie bei Ascorbinsäurereiz

während das Maximum etwa bei 2000 U liegt, sodaß die mit Ascorbinsäure hervorgerufene Amylaseausschüttung meist übertroffen wird. Zur Gesamt-Amylase des Reizspeichels trägt die Submandibulardrüse, wie auch bei Ascorbinsäurereiz, 10 - 15 % bei. Eine Korrelation des Serumamylasegehaltes mit der Amylaseausschüttung über 50 Minuten oder mit der Amylaseaktivität pro Milliliter konnte nicht festgestellt werden.

IV Bestimmung der Gesamt-Eiweißkonzentration.

Da Amylasekonzentration, Amylaseausscheidung pro Minute und pro 50 Minuten beim Gesunden so hohen Schwankungen unterliegen erscheint es sinnvoll als weiteres Kriterium die Gesamteiweißbestimmung in die Untersuchung mit einzubeziehen.

1.) Parotis

Ruhewerte.

Im unstimulierten Speichel konnten Eiweißkonzentrationen zwischen 1,0 und 5,0 mg/ml gemessen werden.

Gustatorische Stimulation.

Es ergibt sich ein Bild, ähnlich dem der Amylaseaktivitätsmessung pro ml. Alle Drüsen zeigen mehr oder minder starke Reaktion, die auch gegenläufig ausfallen kann. Insgesamt wird die Bandbreite der im Ruhespeichel bestimmten Grenzen nämlich 1 - 5 mg/ml nicht wesentlich über- oder unterschritten. Nach Reizende kehren die meisten Kurven zu ihrem individuellen Ausgangswert zurück, unabhängig ob sie bei Reiz anstiegen oder abfielen (Abb 13).

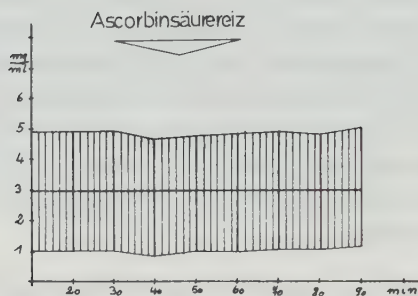


Abb. 13 Gesamteiweißkonzentration im Parotisssekret bei gustatorischem Reiz

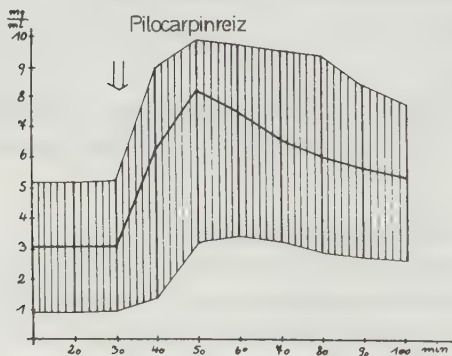


Abb. 14 Gesamteiweißkonzentration im Parotisssekret bei Pilocarpinreiz

Pilocarpinstimulation.

Im Gegensatz zum Ascorbinsäurereiz steigt die Eiweißkonzentration bei Pilocarpinreiz stark an und erreicht Werte 3 - 10 mg/ml. Tendenz zur Rückkehr zu den Ruhewerten konnte kaum beobachtet werden. Die Maximalwerte konnten zu jeden Zeitpunkt im beobachteten Abschnitt auftreten (Abb 14).

2. Submandibulardrüse.

Ruhewerte.

Obwohl die Amylasekonzentration in der Submandibulardrüse viel geringer war als in der Parotis, wurden Gesamteiweißwerte gefunden, die fast im gleichen Bereich lagen, nämlich 0,5 - 4,0 mg/ml.

Gustatorischer Reiz.

Das Verhalten ist wie bei der Parotis: der vom Ruhewert abgegrenzte Bereich wird nicht wesentlich über- oder unterschritten.

Der Verlauf des Gesamteiweißes entspricht in diesem Falle nicht dem Verlauf der Aktivität pro Milliliter, die eindeutig während des Reizes anstieg (Abb 15).

Pilocarpinstimulation.

Die Gesamteiweißkonzentration steigt in der Submandibulardrüse nicht so stark an wie bei der Parotis. Es werden Werte bis max. 6,5 mg/ml gemessen. Das besagt aber nicht, daß weniger Protein ausgeschieden wird, denn die Flußrate ist im allgemeinen bei Pilocarpinreiz stärker erhöht als bei der Parotis. Der eindeutige Gipfel, den Aktivität pro Milliliter und Ausscheidung pro Minute nach 20 Minuten Reizdauer aufweisen, spiegelt sich in der Eiweißkonzentration nicht wieder (Abb 16).



Abb. 15 Gesamteiweißkonzentration im Submandibulärsekret bei gustatorischem Reiz

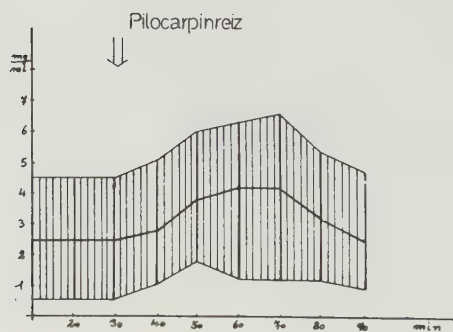


Abb. 16 Gesamteiweißkonzentration im Submandibulärsekret bei Pilocarpinreiz

Für die Tatsache gleicher Eiweißkonzentration aber stark unterschiedlicher Amylaseaktivität sind zwei Erklärungen möglich:

- a) Die Proteinzusammensetzung ist bei Ruhe und Reiz nicht konstant,
- b) die ausgeschiedene Amylase hat nicht unter allen Bedingungen gleiche Aktivität pro Milligramm Enzymprotein.

Diese Hypothese wäre denkbar, da mehrere Isoamylasen bekannt sind (10), die in zwei Gruppen eingeteilt werden, von denen die eine einen Polysaccharidanteil besitzt und die andere nicht (48).

V Bestimmung des Amylaseanteiles an der Gesamtproteinmenge bei Ruhe und Reiz mit Hilfe der Densitometrie (Abb 17).

1.) Parotis.

Ruhewerte

Für den Anteil der Amylase am Gesamtprotein ergaben sich Ruhewerte zwischen 32 und 48 %.

Gustatorischer Reiz.

Die eigenen Ergebnisse zeigen in der Phase 10 - 20 Minuten nach Reizbeginn recht einheitlich einen Anstieg des prozentualen Amylaseanteils auf 35 - 55 Relativ Prozent der Gesamteiweißausschüttung. Danach gehen die meisten Werte wieder etwas zurück, obwohl

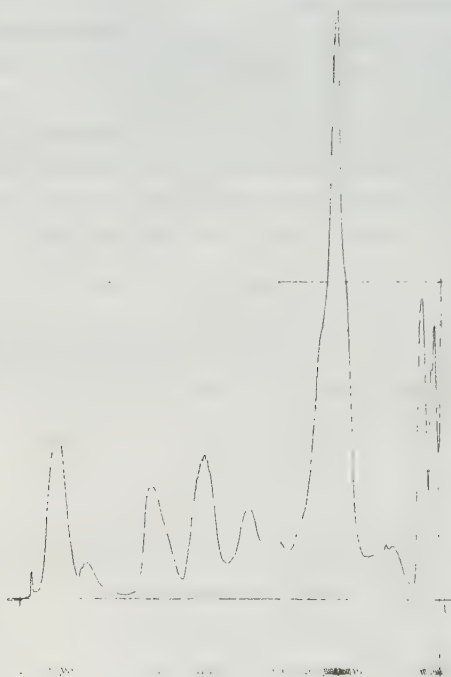


Abb. 17
Beispiel für die
densitometrische
Auswertung der
comassiegefärbten
Diskelektrophorese
läufe mit gleich-
zeitiger Impuls-
schreibung

weiter stimuliert wird. Nach Absetzen des gustatorischen Reizes fällt der Relativprozentanteil weiter ab und erreicht nach 20 Minuten wieder Ausgangswerte (Abb 18 oberer Teil).

Pilocarpinstimulation.

Hier finden wir ebenfalls die Latenzzeit von 10 Minuten nach Reiz, gefolgt von einem einheitlichen Anstieg, der jedoch unterschiedlich lange, von der zweiten bis sechsten Reizfraktion dauern kann. Die erreichten Werte liegen im gleichen Bereich wie bei Cebionreiz, 35 - 55 Relativ-Prozent. Eine Rückkehr zu den Ruhewerten ist nicht abzusehen (Abb 19 und Abb 20).

2. Submandibularis.

Ruhewerte.

Die gefundenen Ruhewerte liegen bei 7 - 20 Relativ-Prozent, also wesentlich niedriger als bei der Parotis.

Gustatorische Stimulation.

Bei Stimulation mit Ascorbinsäure haben wir starke Annäherung mehrerer Kurven in einem Bereich zwischen 12 und 16 %, danach beinahe linearen Verlauf. Nur wenige Punkte liegen außerhalb davon. Nach Beendigung der Simulation wieder stärkere Auffächerung und Annäherung an die Ruhewerte (Abb. 18). Dieses Ergebnis gibt auch keine Erklärung für den deutlichen Höchstwert der Amylaseaktivität.

Pilocarpin-Stimulation.

Bei mehreren Probanden scheint ein ähnliches Ergebnis einzutreffen wie bei Ascorbinsäurestimulation, nämlich eine Annäherung der Kurven nach 30 Minuten bei

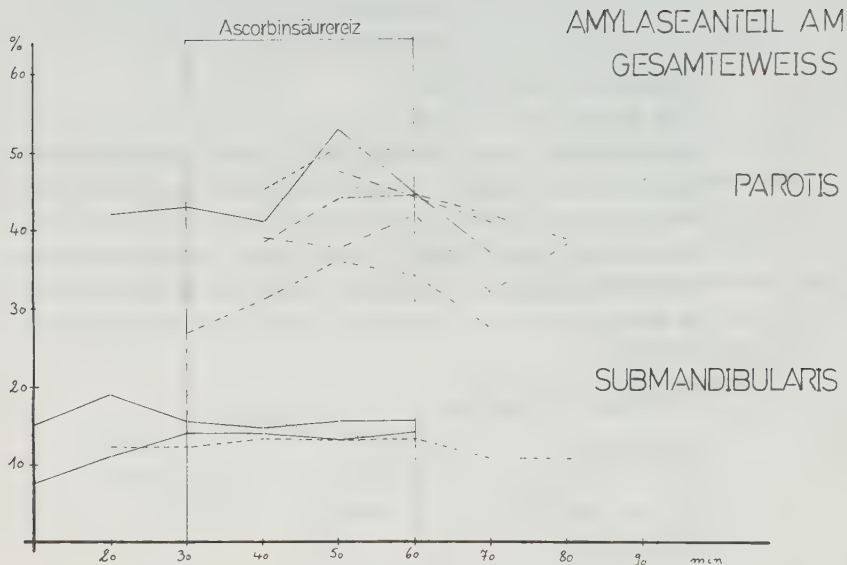


Abb. 18 Amylaseanteil am Gesamteiweiß bei
Ascorbinsäurereiz
im Parotissekret oben
im Submandibularsekret unten

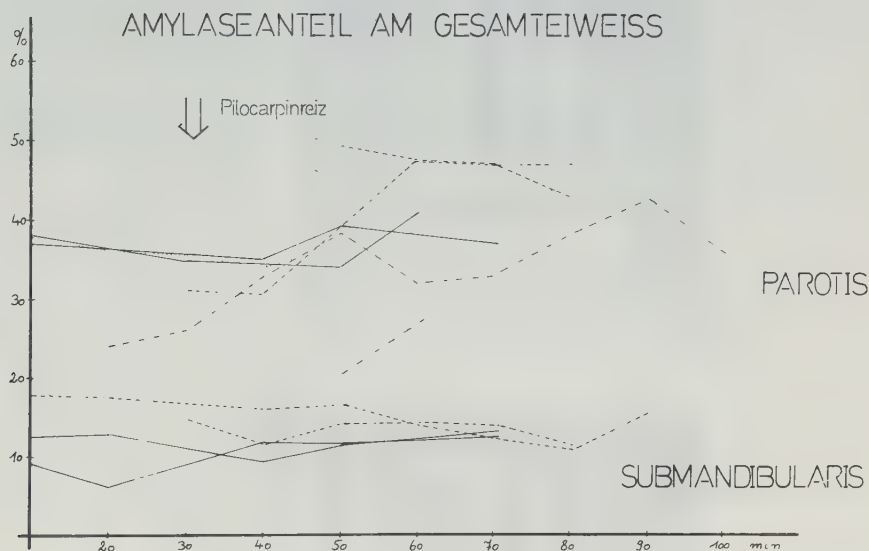


Abb. 19 Amylaseanteil am Gesamteiweiß bei
Pilocarpinreiz
im Parotissekret oben
im Submandibularsekret unten

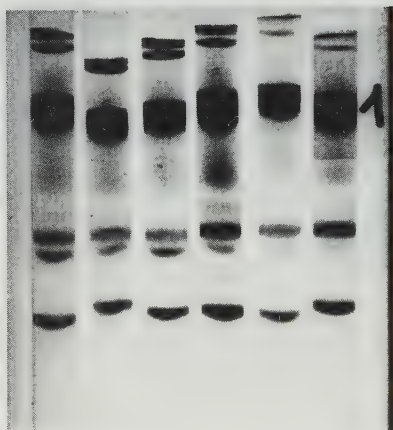


Abb. 20
Parotissekret bei
Ruhe 1-3 und Pilo-
carpinstimulation
4-6
Comassie gefärbte
Diskelektrophorese-
läufe eines Probanden

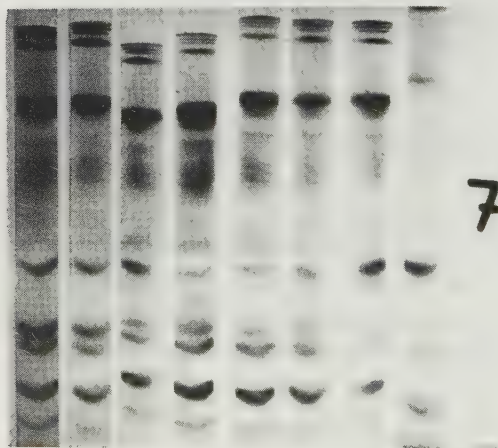


Abb. 21
Submandibularsekret bei Ruhe 1 und 2, bei Pilo-
carpinstimulation 3-8, Comassie gefärbte Disk-
elektrophoreseläufe eines Probanden

10 - 16 %. 2 Probanden, deren Sekret bisher völlig unauffällig im Mittelwertbereich bei den verschiedenen dargestellten Ergebnissen lag, zeigen abnorm hohe prozentuale Beteiligung der Amylase am Gesamt-Protein (Abb 19 und Abb 21).

Insgesamt ergibt sich, daß Gesamteiweiß, Flußrate, Prozentanteil und Amylaseausscheidung bei der Parotis gut zusammenpassen, und deshalb Aktivitätsunterschiede der Isoamylasen keine sehr große Rolle spielen werden.

Anders bei der Submandibulardrüse, wo die erhöhte Aktivität pro Milliliter bei Ascorbinsäurereiz und der deutliche Höchstwert 20 Minuten nach Pilocarpinreiz nicht ausreichend durch die aufgeführten Parameter erklärt werden.

VI Aktivität der Amylase in Abhängigkeit von der Ausscheidungsdauer und von der ausgeschiedenen Amylasemenge.

Im Folgenden soll der Quotient, der sich aus den schon dargestellten Ergebnissen Enzymaktivität in U/ml und Enzymproteinkonzentration in mg/ml berechnen läßt, als spezifische Enzymaktivität bezeichnet werden. ($\text{U/ml}:\text{mg/ml} = \text{U/mg}$).

1.) Parotis.

Die für die erste Reizfraktion erhaltenen Werte liegen um 200 bis 370 U/mg. Über weitere 10 Minuten ergibt sich relative Konstanz bei gustatorischer Stimulierung, dann jedoch fällt die spezifische Aktivität um etwa 50 - 100 U/mg. Nach Reizende erfolgt ein sofortiger Anstieg zu den Ausgangswerten,

danach ein geringes Absinken.

2.) Submandibulardrüse.

Die Ruhewerte variieren hier noch stärker als bei der Parotis, sie beschreiben Werte zwischen 100 und 350 U/mg. Eine eindeutige Verlaufstendenz kann nicht angegeben werden, jedoch fällt auf, daß die bei Pilocarpinreiz gefundenen spezifischen Aktivitäten geringer sind als die bei Ascorbinsäurereiz.

Bei Untersuchung der Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der in einer Minute ausgeschiedenen Enzymeiweißmenge, kann man feststellen, daß bei der Parotis eine Erhöhung der Amylaseproteinsekretion nicht mit Senkung der Aktivität einhergeht und daß kein Unterschied zwischen in Ruhe oder Reiz sezerniertem Enzym besteht. Die individuelle Größe der spezifischen Enzymaktivität scheint in einem breiterem Bereich verteilt (Abb 22). Ebenso verhält es sich in der Submandibulardrüse. Die Berechnungen ergeben, daß Cebionreiz im allgemeinen geringere Enzymprotein-Ausschüttung bewirkt als Pilocarpinreiz, daß diese jedoch mit relativ hoher spezifischer Aktivität gekoppelt ist.

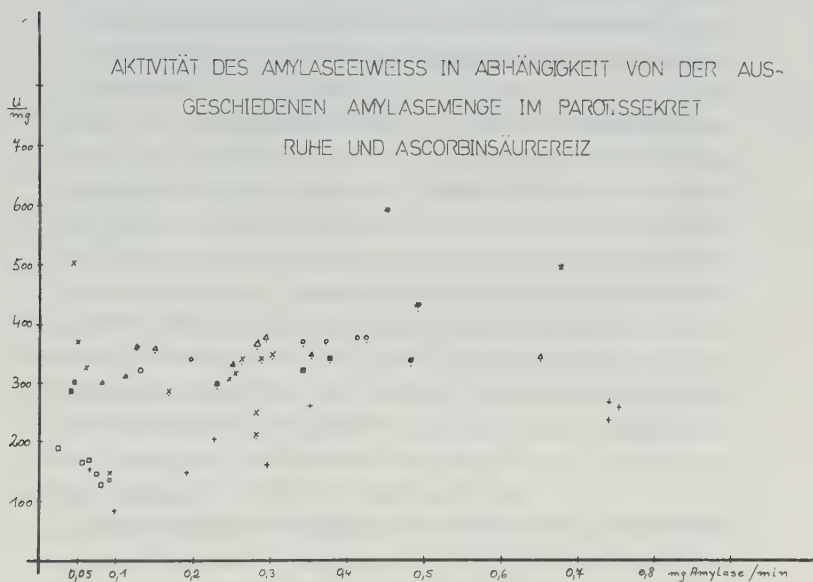


Abb. 22 Aktivität des Amylaseeiweiß in Abhängig-
keit von der ausgeschiedenen Amylase-
menge im Parotissekret bei Ruhe und As-
corbinsäurereiz, es ist
keine direkte Abhängigkeit feststellbar

E Diskussion

Von der Überlegung ausgehend, durch Amylasebestimmung Hinweise auf pathologische Vorgänge in den Speicheldrüsen erhalten zu kennen, sollte als Voraussetzung bei einem Kollektiv von gesunden Personen das Verhalten der Drüsen bei Ruhe und verschiedenen Reizqualitäten, systematisch unter genormten Bedingungen, getestet werden. Dazu waren es notwendig in umfangreichen Voruntersuchungen die verschiedenen Amylasetests zu überprüfen. Beim Dyamyltest der Firma GÖDECKE und bei der Methode mit Amylopektin-Azur entstanden schon bei der Bestimmung des Leerwertes große Schwierigkeiten. Trotz genauer Beachtung der Arbeitsvorschriften gelang es nicht diesen Wert mit ausreichender Genauigkeit bei mehreren Parallelbestimmungen zu reproduzieren. Das Abpipettieren des Überstandes erwies sich als eine besonders große Fehlerquelle, da schon bei ganz leichter Erschütterung des Glases, beim Herausnehmen^{aus} der Zentrifuge, der Bodensatz aufgewirbelt wurde. Es sieht so aus, als ob die Farbstoff tragenden Moleküle mittlerer Größe nicht genügend sedimentiert werden. Der Versuch diese Moleküle, durch Zugabe von Serum nach Beendigung der Reaktion, vor Zentrifugation, und die damit verbundene Eiweißausfällung im Sediment zu stabilisieren, brachte nicht den erhofften Erfolg. Der Verdacht, daß ungenügende Konstanz des Versatol-E mitschuldig an den ungenauen Ergebnissen sei, konnte durch Überprüfung mit anderen Testmethoden ausgeschlossen werden, die sehr gute Konstanz für diese Substanz ergaben. Die Messung der reduzierenden Zucker mit Dini-

trosalicylsäure liefert brauchbare Ergebnisse, ist jedoch für die routinemäßige Untersuchung relativ aufwendig. Wegen der besten Reproduzierbarkeit und gleichzeitig einfachsten experimentellen Anordnung wurde zur Untersuchung der α -Amylaseaktivität im im folgenden die Stärke-Jodprobe nach STREET-CLOSE nach Vorschrift der Firma MERCK verwendet. Diese gestattete rationelles Arbeiten, obwohl zur Kontrolle alle Bestimmungen doppelt ausgeführt wurden. Für die Analysen wurde mit Hilfe einer Hamilton-spritze auf 1:2000 oder bei hoher Aktivität bis 1:4000, das Submandibularsekret auf 1:500 oder 1:1000 verdünnt um im genauen Meßbereich zu arbeiten. Mit dem Mercktest wurden noch weitere Vorversuche durchgeführt, die sich mit Lagerung und Haltbarkeit der Speichelproben beschäftigten.

Die gute Konstanz der Amylaseaktivität im Serum (31) und im Harn (32) über zwei bis vier Wochen bei Lagerung im Kühlschrank bei Temp. von 0-4°C, wird auf die Resistenz der nicht denaturierten Amylase gegenüber Proteasen wie Trypsin zurückgeführt (33) und gilt auch für die Speichelamylase. Einmal in Aqua bidest. verdünnte α -Amylase verlor innerhalb einer Stunde deutlich an Aktivität. Erstaunlich war die Feststellung, daß bei Lagerung bei Zimmertemperatur über Nacht, bei mehreren Proben die α -Amylaseaktivität deutlich anstieg. Der Grund für diesen Effekt ist mir nicht bekannt.

Weiterhin wurde von einem Patienten nach Cebionreiz jede Minute die Amylaseaktivität für Parotis und Submandibularis bestimmt. Dabei ergab sich, daß nach 10 Minuten für die Parotis, nach etwa 8 Minuten für

die Submandibulardrüse die Aktivität anstieg. Etwa das gleiche Intervall schien für die systemische Verteilung des subcutan injizierten Pilocarpin notwendig. Aus diesem Grunde wurden für alle folgenden Bestimmungen Fraktionsintervalle von 10 Minuten verwendet.

Amylaseaktivität in Units pro Milliliter.

	Ruhe	Ascorbinsäure	Pilocarpin
Parotis	100-600	100-600	600-1200
Submandibularis	10-55	50-100	30-135

Der Überblick zeigt, daß die α -Amylasekonzentration des Parotissekretes durchschnittlich 5-10x so hoch liegt, wie die des Submandibularsekretes.

Dies stimmt in etwa mit den Ergebnissen von JAKOBSEN (32) überein, der angibt, daß 1/5 der gesamten Amylaseaktivität von der Submandibulardrüse gebildet wird.

Die breite Streuung der Normalwerte der Amylaseaktivität soll möglicherweise von der Zusammensetzung der Nahrung beeinflußt sein, welche Anpassungsvorgänge auslösen könnte, in dem Sinn, daß Nahrung mit großem Stärkeanteil über längere Zeit eingenommen, Anstieg der Amylasekonzentration bewirkt (35).

Auch NEWBRUN (36) berichtet über die großen Unterschiede im Speichelamylasegehalt verschiedener Personen. Gut vereinbar mit meinen Ergebnissen ist die Tatsache, daß auch für Harn (37,38) eine große Streubreite in der Amylasekonzentration gefunden wurde, ebenso für Serum (STREET 500 - 2700 U/l).

Die circadianen Schwankungen , und Nahrungsaufnahme der Probanden sollten möglichst geringen Einfluß ausüben, so wurde die Speichelabnahme immer morgens gegen 8⁰⁰ Uhr begonnen, etwa 3/4 - 1 Stunde nach dem Frühstück. Die Ergebnisse sind mit anderen in der Literatur angegebenen nur schwer vergleichbar, da unterschiedliche Meßverfahren und unterschiedliche Definitionen der Einheiten verwendet werden.

Die von MEYER (39) angegebenen Ruhewerte sind nach Umrechnung in U/ml etwa um den Faktor 10 größer, der Schwankungsbereich stimmt unter Berücksichtigung dieses Faktors mit dem hier gefundenen überein. Die Ergebnisse der selben Autoren für Stimulation mit naturreinem Zitronensaft, nämlich signifikanter Aktivitätsabfall innerhalb 5 Minuten, stehen im Gegensatz zu den hier mit Ascorbinsäurereiz gefundenen Werten.

SCHNEYER (40) berichtet bei Stimulation mit 10 %iger Zitronensäure über unveränderte Amylaseaktivität, was mit meinen Ergebnissen ganz gut korreliert.

Übereinstimmend mit BRANDTZAEG (41), MANDEL (42) und MEYER (39) reichen Konzentrationsbestimmungen nicht aus, um aussagekräftige Ergebnisse über das Sekretionsverhalten der Speicheldrüsen zu gewinnen. Es sollte immer die Flußrate mit angegeben werden, ebenso bietet sich die Gesamtproteinmenge als aufschlußreiche Bezugsgröße an.

Die untere Grenze der Flußrate, die NEWBRUN (36) angegeben hat, stimmt mit den hier gefundenen überein, die von ihm genannte Obergrenze wurde jedoch nicht erreicht.

SCHNEYER fand (48), daß die Sekretionsrate für

Amylase nach gustatorischer Stimulation mit 1% - iger Zitronensäure stark ansteigt, daß aber wie schon gezeigt, die Amylasekonzentration dabei nicht verändert wird. Meine Ergebnisse bestätigen dies völlig.

Für die Submandibulardrüse liegt auf Grund der größeren Schwierigkeiten bei der Sekretabnahme kein entsprechendes Vergleichsmaterial vor.

Einen Einfluß auf das Ergebnis des Gesamtprotein-gehaltes hat das für die Aufstellung der Eichkurve verwendete Protein (29). Da Parotisspeichel in hohem Maße aus Amylase besteht, wurde aus Sephadex-Säulenläufen gewonnene, dialysierte und lyophilisierte Amylase verwendet.

Bemerkenswert ist, daß der hohe prozentuale Anteil der Amylase am Gesamtprotein in der Parotis bei Stimulation mit Ascorbinsäure und Pilocarpin noch weiter ansteigt. Dies könnte als Hinweis darauf dienen, daß Amylase als speziell parotisspeichelspezifisches Protein anzusprechen ist, da die meisten anderen untersuchten Speichelparameter (Albumin, Ig E) bei Reiz absinken.

Etwas anders ist das Bild bei der Submandibulardrüse, wobei Reiz zum Teil neue anodennahe Banden in der Diskelektrophorese auftreten und der Amylasenanteil trotz größerer Streubreite in Ruhe, sich auf einen eng begrenzten Bereich konzentriert.

Dieser speichelspezifische Charakter und die enge Begrenzung bei der Submandibularis, lassen vermuten, daß sich die Amylasebestimmung als Indikator für Erkrankungen trotz der großen Variationsmöglichkeiten der einzelnen Werte eignen wird. Günstig

ist in diesem Sinne auch, daß für die Analyse nur sehr geringe Sekretmengen benötigt werden, da bei Speicheldrüsen-erkrankungen die Flußrate häufig erniedrigt ist.

Studien über Isoamylasen, ihre Zusammensetzung im Nativspeichel, ihre Struktur und ihre Eigenschaften, wurden von mehreren Autoren erstellt.

Vier bis acht amylolytische Bestandteile können aus Parotisspeichel durch Geldektrophorese (43), Discelektrophorese (44,45), und isoelektrische Fokussion (12) getrennt und isoliert werden.

SKUDE (46) gibt sogar 16 Isoamylasevarianten an. MAYO und CARLSON (12) konnten aus Submandibularspeichel vier Isoamylasen isolieren.

Zwei Familien können durch Gelfiltration (47) getrennt werden, deren Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung nur gering sind. Das Molekulargewicht wird zwischen 52000 und 57000 angegeben; gebundene Kohlenwasserstoffe (48) bei einem Teil der Isoenzyme sollen diese Differenz bewirken.

LAMBERTS (47), OGITA (49) und BOETTCHER und LANDE (50) fanden für Parotis- und Submandibularspeichel identische Isoenzymmuster, ein Ergebnis, dem BIRKHED und SÖDER (51) widersprechen.

Nach der Arbeit von MUUS und VNENCHAK (52) herrscht die Meinung einfacher genetischer Kontrolle der Isoamylasen im menschlichen Speichel vor. Bei Familienreihenuntersuchungen (50) konnten keine genau übereinstimmenden Enzymmuster gefunden werden. Bei einer solchen Untersuchung eineiiger Zwillinge zeigten WOLF und TAYLOR (53) für eine Isoenzymbande, von ihnen C-2 genannt, strenge Übereinstimmung auf.

Heute vertritt die Mehrzahl der Untersucher die Ansicht, daß mehrere Strukturen für die Isoamylasenzusammensetzung verantwortlich sind. Ausgehend von der Hypothese, daß die verschiedenen Isoamylasen verschiedene Aktivität pro mg sezernierter Amylase haben, untersuchten wir, ob sich während der Reizphase die Enzymaktivität pro mg Protein verändert.

Dabei fanden wir, daß nach längerer gustatorischer Stimulation der Parotis bei der Mehrzahl der Probanden die Enzymaktivität pro mg Protein etwas fällt und nach Reizende wieder Ausgangswerte erreicht. Ähnlich war das Verhalten bei Pilocarpinreiz, jedoch war die "Erholungsphase" verlängert. Inwieweit diese Verminderung auf eine Verschiebung der Isoamylasemuster zurückzuführen ist bzw. auf eine pH-Wertveränderung oder andere Faktoren ist durch weitere Untersuchung zu klären.

Zusammenfassung:

Bei vergleichenden Versuchen mit Amylasetests nach verschiedenen Prinzipien wurde die günstigste und am besten reproduzierbare Meßanordnung ermittelt. Von 5 Methoden wird der Jod-Stärke-Test der Firma MERCK zur Ausführung der Versuche gewählt. Gemessen wird die Amylasekonzentration in U/ml im Parotis- und Submandibularsekret bei Ruhe, bei gustatorischem Reiz und bei Pilocarpinreiz. Der gustatorische Reiz führt bei der Parotis zu wenig ausgeprägten Konzentrationsänderungen, während Pilocarpinreiz einen eindeutigen Aufstieg der Konzentration bewirkt.

Die Submandibulardrüse reagiert bei beiden Reizqualitäten mit einem Anstieg der Konzentration. Die Bestimmung der Serumamylase unmittelbar nach der Speichelentnahme ergibt bei allen Probanden Werte im Normalbereich. Unter Einbeziehung der Flußrate wird die Amylaseausscheidung pro Minute errechnet.

Bei Pilocarpinreiz kann sie bei der Parotis bis auf das Doppelte des gustatorischen Reizes ansteigen, bei der Submandibulardrüse sogar bis auf das Dreifache, wobei die absoluten Werte bei letzterer um den Faktor 5 - 10 kleiner sind als bei der Parotis.

Des weiteren wird die Gesamteiweißkonzentration gemessen und mit Hilfe derdensitometrischen Auswertung von comassiegefärbten Diskelektrophoresegelen der Amylaseanteil am Gesamtprotein bestimmt. Dies ergab, daß bei dem Parotissekret bei beiderlei Reiz der Amylaseanteil anstieg, bei dem Submandibularsekret je-

doch sich auf einen Wert von 10 - 15 % einstellt. Aus den schon durchgeführten Analysen wird berechnet wie groß die Aktivität von einem Milligramm Amylaseprotein ist. Es zeigt sich, daß diese Größe offenbar nicht konstant ist, sondern sich in den verschiedenen Reizfraktionen verändert und noch größere Unterschiede bei verschiedenen Individuen auftreten, wobei jedoch keine Abhängigkeit von der Menge des insgesamt ausgeschiedenen Amylaseproteins nachweisbar ist.

Literaturverzeichnis

- 1) MYRBÄCK K., NEUMÜLLER Q.: Amylases and the Hydrolysis of Starch and Glycogen, The Enzymes 1st ed., Vol I, 653 (1950)
- 2) FRIED R., HOEFELMAYR R.: Die Bestimmung der α -Amylase in Serum und Urin
Ärztl. Lab. 11, 42 (1965)
- 3) MEYER K. H., FISCHER E. H., BERNFELD P.:
Sur les enzymes amylolytiques I. L'isolement de l' α -amylase de pancréas
Helv. chim. Acta 30, 64 (1947)
- 4) HEATLEY N. G.: Spontaneous Crystallization of Amylase from Pankreatic Juice of the Rat
Nature 181, 1069 (1958)
- 5) FISCHER E. H., DUCKERT F., BERNFELD P.
Sur les enzymes amylolytiques XIV; Isolement et cristallisation de l' α -Amylase de pancréas humain, Helv. chim. Acta 33, 1060 (1950)
- 6) MEYER K. H., FISCHER E. H., STRAUB A., BERNFELD P.: Sur les enzymes amylolytiques X; Isolement et cristallisation de l' α -amylase de salive humaine, Helv. chim. Acta 31, 2158 (1948)
- 7) WHELAN W. J., ROBERTS P. J. P.: Action of Salivary α -amylase on Amylopectin and Glycogen
Nature 170, 748 (1952)
- 8) WHELAN W. J., ROBERTS P. J. P.: The mechanism of carbohydrase action: Part II α -amylolysis of linear substrates, J. Chem. Soc. (Org.) 1298 (1953)
- 9) SEMENZA G.: Selected Topics in Carbohydrate Biochemistry: Digestion and Absorption of Sugars in the Intestinal Tract, Caries Res. 1, 187 (1967)

- 10) ABDULLAH M., FRENCH D., ROBYT J. F.: Multiple attack by α -amylases, Arch. Biochem. 114, 595 (1966)
- 11) ROBYT J. F., FRENCH D.: Multiple Attack Hypothesis of α -Amylase Action: Action of Porcine, Pancreatic, Human Salivary and Aspergillus oryzae α -Amylases, Arch. Biochem. 122, 8 (1967)
- 12) MAYO J. W., CHARLSON DONM.: Isolation and Properties of four α -Amylase Isoenzymes from Human Submandibular Saliva, Arch. Biochem. 163, 498 (1974)
- 13) HEHRE E. J., GENGHOF D. S.: The α -Amylases as Glycosylases, with wider Catalytic Capacities than Envisioned or Explained by their Representation as Hydrolases, Arch. Biochem. 142, 382 (1971)
- 14) STREET H. V., CLOSE J. R.: Determination of Amylase Activity in Biological Fluids, Clin. chim. Acta 1, 256 (1956)
An Ultra-Micro Method for Determination of Amylase Activity in Blood Serum, Clin. Chim. Acta 3, 476 (1958)
- 15) SMITH B. W., ROE J. H.: A Photometric Method for the Determination of α -Amylase in Blood and Urine, with Use of Starch-Iodine Colour, J. Biol. Chem. 179, 55 (1949)
- 16) NOELTING G., BERNFELD P.: Sur les enzymes amylolytiques III. La β -amylase: dosage d'activité et contrôle de l'absence d' α -amylase, Helv. Chim. Acta 31, 286 (1948)
- 17) SOMOGYI M.: Mikromethods for the Estimation of Diastase, J. Biol. Chem. 125, 599 (1938)

- 18) SOMOGYI M.: Modifications of two Methods for the Assay of Amylase, Clin. Chem. 6, 23 (1960)
- 19) BABSON A. L., TENNEY S. A., MEGRAW R. E.: New Amylase Substrate and Assay Procedure, Clin. Chem. Vol. 16, No 1, 39 (1970)
- 20) WEIS H. J., CÖLLE H., NORD H. J.: Eine verbesserte Bestimmung der Amylase mittels Amylopektin Azur, Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 10 Jg., Heft 5, 226 (1972)
- 21) Report of the Commission on Enzymes of JUB: FLORKIN M., STOTZ E. H., Comprehensive Biochemistry 13, 6 (1965)
- 22) FREEMAN M. E.: Clinical Enzyme Unitage, Clin. chim. Acta 6, 300 (1961)
- 23) KING E. J.: International Enzyme Units and Isoenzyme Nomenclature, J. Clin. Path. 16, 391 (1963)
- 24) HENRY R. J., CHIAMORI N.: Study of the Sacharogenic Method for the Determination of Serum and Urin Amylase, Clin. Chem. 6, 434 (1960)
- 25) CLOTTEN, im Druck
- 26) RICK W., STEGBAUER H. P.: α -Amylase Messung der reduzierenden Gruppen, in: Methoden der enzymatischen Analyse, Hrsg. BERGMAYER H. U. Band I, 3. Aufl. 1974
- 27) SCHIWARA H. W. Ein UV-Test zur Messung der α -Amylase-Aktivität in Serum und Urin, Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 10, 12 (1972)
- 28) GORNALL A. G., BARDAWILL C. S., DAVID M. M. Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction, J. Biol. Chem. 177, 751 (1949)

- 29) ARNEBERG P.: Quantitative Determination of
Albumin, Lysozyme, and Amylase J. dent.
Res. 78, 435 (1970)
- 30) MAURER R.: Diskelektrophorese. Theorie und
Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-
Elektrophorese De Gruyter 1968
- 31) STREET H. V. unveröffentlicht
- 32) SAXON E. J., HINKLEY W. C., VOGEL W. C.,
LIEVE L.: Comparative Value of Serum and
Urinary Amylase in the Diagnosis of acute
Pankreatitis Arch. int. Med. 99, 607 (1957)
- 33) STEIN E. A., FISCHER E. H.: The Resistance
of α -Amylases towards Proteolytic Attack,
J. biol. Chem. 232, 867 (1958)
- 34) JACOBSEN N.: Salivary Amylase II: Alpha-
Amylase in Salivary Glands of the Macacairus
Monkey, the Cercopithecus aethiops Monkey
and Man Caries Res. 4, 200 (1970)
- 35) SQUIRES B. T.: Human Salivary Amylase Secretion
in Relation to Diet, J. Physiol. 119, 153
(1953)
- 36) NEWBRUN E.: Observations on the Amylase Content
and Flow Rate of Human Saliva Following
Gustatory Stimulation, J. dent. Res 41, 459
(1962)
- 37) RICK W., STEGBAUER H.: Zur Bestimmung der Amy-
laseaktivität im Harn, Zs. anal. Chem.
243, 415 (1968)
- 38) STREET H. V., CLOSE J. R.: Serum Amylase
Activity Normal Values, Nature 179, 164 (1957)
- 39) MEYER P., NÜRNBERGER E.: Zur Sekretion von
Amylase und saurer Phosphatase durch die Parotis

- des Menschen vor und nach gustatorischer Stimulation unter Berücksichtigung der Enzymkonzentration und der Enzymsekretionsrate, Laryng. Rhind. 53, 223 (1974)
- 40) SCHNEYER L. H.: Amylase content of separate salivary gland secretion of man, J. appl. Physiol. 9, 453 (1956)
- 41) BRANDTZAEG P.: Human Secretory immunoglobulins VII, Concentrations of Parotid JgA and other Secretory Proteins in Relation to the Rate of Flow and Duration of Secretory Stimulus Archs. oral Biol. 16, 1295 (1971)
- 42) MANDEL J. D., KHURANA H. S.:
The Relation of Human Saliva γ -A-Globulin and Albumin to flow rate. Arch. oral Biol. 14, 1433 (1969)
- 43) WOLF R. O., TAYLOR L. L.: Isoamylases of Human Parotid Saliva Nature 213, 1128 (1967)
- 44) CALDWELL R. C., PIGMAN W.: Disc Electrophoresis of Human Saliva in Polyacrylamide Gel Arch. Biochem. Biophys. 110, 91 (1965)
- 45) KAUFFMAN D. L., ZAGER N. J., COHENE., KELLER P.J.
The Isoenzymes of Human Parotid Amylase, Arch. Biochem. Biophys. 137, 325 (1970)
- 46) SKUDE G.: Isoenzyme Variation of Human Salivary Amylase, Humangenetik 12, 255 (1971)
- 47) LAMBERTS B. L., MEYER T. S., OSBORNE R. M.:
A comparative Study of Human Parotid and Submaxillary Amylase, Arch. oral Biol. 16, 517 (1971)
- 48) KELLER P. J., KAUFFMAN D. L., ALLAN B. J., WILLIAMS P. J.: Further Studies on the

Structural Differences between the Isoenzymes
of Human Parotid α -Amylase, Biochem. Vol. 10,
Nr. 26, 4867 (1971)

- 49) OGITA S.: Genetico-Biochemical Studies on the
Salivary and Pancreatic Amylase Isozymes in
Human, Medical Journal of Osaka University
16, 271 (1966)
- 50) BOETTCHER B., de la LANDE: Electrophoresis
of Human Saliva and Identification of Inherited
Variants of Amylase Isoenzymes, Aust. J. exp.
Biol. med. Sci. 470, 97 (1969)
- 51) BIRKHED D., SÖDER P. Ö.: The Presence of Iso-
 α -Amylases in Human Saliva,
Arch. oral Biol. 18, 203 (1973)
- 52) MUUS J., VNENCHAK J. M. Isozymes of Salivary
Amylase, Nature 204, 283 (1964)
- 53) WOLF R. O., TAYLOR L. L., NISWANDER J. D.,
SCHWARTZ J.: The Heritability of Human Salivary
Isoamylases, Arch. oral Biol. 16, 1357 (1971)

Herrn Prof. Dr. H. H. Naumann danke ich für die Überlassung des Themas und die guten Arbeitsbedingungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. H. Eichner für seine hilfreiche Unterstützung und sein wohlwollendes Interesse.

Für das stets freundliche Entgegenkommen und viele gute Ratschläge möchte ich Herrn Priv. Doz. Dr. Bretzel meinen herzlichen Dank aussprechen.

Lebenslauf

Am 24. Februar 1952 kam ich als einzige Tochter des Kaufmannes Edwin Thomas, und seiner Frau Erna, geborene Lehmann in Miesbach zur Welt und erhielt die römisch-katholische Taufe.

Ich besuchte von 1958 - 62 die Volksschule in Miesbach, anschließend den naturwissenschaftlichen Zweig des Staatlichen Gymnasiums in Miesbach, bis zur Reifeprüfung im Mai 1971.

Mit dem Wintersemester 1971/72 nahm ich das Studium der Zahnmedizin in München auf, legte im Frühjahr 1974 das Physikum ab und beendete das Studium am 1.2.1977 mit der zahnärztlichen Prüfung.

Am 25.3.1977 fand die Eheschließung mit Herrn Horst Hermenau aus Holzkirchen, Student an der Akademie der bildenden Künste in München, statt.

Am 15.5.1977 trat ich meine Stellung als Assistenzzahnarzt bei Herrn Doktor H. Giehl in Bad Tölz an.

